

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-099089

(43)Date of publication of application : 21.04.1998

(51)Int.Cl.

C12P 17/06  
A61K 31/35  
C07D311/36  
C07K 14/415

(21)Application number : 09-243184

(71)Applicant : PROTEIN TECHNOL INTERNATL INC

(22)Date of filing : 08.09.1997

(72)Inventor : BRYAN BARBARA A  
ALLRED MARYANN C

(30)Priority

Priority number : 96 709026 Priority date : 06.09.1996 Priority country : US

(54) AGLUCONE ISOFLAVONE ENRICHED VEGETABLE PROTEIN EXTRACT AND PROTEIN MATERIAL  
AND HIGH GENISTEIN AND DAIDZEIN CONTENT MATERIAL AND THEIR PRODUCTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject extract useful for a genistein raw material, etc., by extracting a vegetable raw material with an aqueous extractant at a pH above the isoelectric point of a protein in the vegetable material, then treating the extract under specific conditions and further carrying out an enzymic treatment for cleaving glucoside bonds.

SOLUTION: This method comprises producing an aglucone isoflavone enriched extract from a vegetable material. The vegetable material containing isoflavone conjugates and a protein is extracted with an aqueous extractant at about pH 6-10 above about the isoelectric point of the protein in the vegetable material and the resultant aqueous extract is then treated at about 2 to about 121°C temperature and about pH 6 to 13.5 for a time period sufficient to convert the isoflavone conjugates into isoflavone glucosides. The isoflavone glucosides in the aqueous extract are subsequently brought into contact with an enzyme capable of cleaving glucoside bonds at about 5 to about 75°C temperature and about pH 3 to 9 for a time period sufficient to convert the isoflavone glucosides into aglucone isoflavones. Thereby, the objective vegetable protein extract is obtained.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 13.11.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 08.03.2004

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 2004-11534

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection] 07.06.2004

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-99089

(43)公開日 平成10年(1998)4月21日

(51)Int.Cl.<sup>8</sup> 識別記号C 1 2 P 17/06  
A 6 1 K 31/35  
C 0 7 D 311/36  
C 0 7 K 14/415

F I

C 1 2 P 17/06  
A 6 1 K 31/35  
C 0 7 D 311/36  
C 0 7 K 14/415

審査請求 未請求 請求項の数67 OL (全 17 頁)

(21)出願番号 特願平9-243184

(22)出願日 平成9年(1997)9月8日

(31)優先権主張番号 08/709026

(32)優先日 1996年9月6日

(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 591151990

プロテイン テクノロジーズ インターナ  
ショナル インコーポレーテッド  
PROTEIN TECHNOLOGIES  
INTERNATIONAL INCO  
RPORATED  
アメリカ合衆国ミズーリ州 63164 セン  
ト ルイス チェッカーボード スクエア  
(番地なし)

(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質抽出物及びタンパク質原料、並びに高ゲニステイン及びダイドゼイン含有原料、及びこれらを製造する方法

(57)【要約】

【課題】 アグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質抽出物及びタンパク質原料、並びに高ゲニステイン及びダイドゼイン含有原料、及びこれらを製造する方法を提供する。

【解決手段】 植物性原料からアグルコンイソフラボン強化抽出物を製造する方法であって、前記植物性原料中のタンパク質のおおよその等電点より高いpHの水性抽出溶媒を用いてイソフラボン複合体及びタンパク質を含む植物性原料を抽出する工程；温度約2℃～約121℃、pH約6～約13.5で、前記水性抽出物を処理する工程；及びグルコシド結合を切断できる酵素に、温度約5℃～約75℃、pH約3～約9で、前記水性抽出物中のイソフラボングルコシドを接触させる工程を有する方法。

(2)

特開平10-99089

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物性原料からアグルコンイソフラボン強化抽出物を製造する方法であって、前記植物性中のタンパク質のおおよその等電点より高いpHの水性抽出溶媒を用いてイソフラボン複合体及びタンパク質を含む植物性原料を抽出する工程；温度約2℃～約121℃、pH約6～約13.5で、イソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換するのに十分な時間、前記水性抽出物を処理する工程；及びグルコシド結合を切断できる酵素に、温度約5℃～約75℃、pH約3～約9で、イソフラボングルコシドをアグルコンイソフラボンに転換するのに十分な時間、前記水性抽出物中のイソフラボングルコシドを接触させる工程を有する方法。

【請求項2】 抽出をpH約6～約10で行う請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記水性抽出物を、pH約9、温度約45℃～約75℃で処理し、前記イソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換する請求項1記載の方法。

【請求項4】 水性抽出物をpH約11、温度約5～約50℃で処理し、イソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換する、請求項1記載の方法。

【請求項5】 酵素にイソフラボングルコシドを接触させる工程が、イソフラボングルコシドを含む前記水性抽出物に有効量の追加の酵素を加えることを含む、請求項1記載の方法。

【請求項6】 前記追加の酵素が、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ酵素、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素、グルコアミラーゼ酵素、ペクチナーゼ酵素及びこれらの組み合わせである、請求項5記載の方法。

【請求項7】 追加の酵素を、前記水性抽出物中に存在する酵素の総濃度が、乾燥基準で前記植物性原料の約0.1重量%～約10重量%となるように加える、請求項5記載の方法。

【請求項8】 前記植物性原料が大豆原料である請求項1記載の方法。

【請求項9】 イソフラボン複合体とイソフラボングルコシドの大部分がアグルコンイソフラボンに転換される請求項1記載の方法。

【請求項10】 実質的にすべてのイソフラボン複合体及びイソフラボングルコシドが、アグルコンイソフラボンに転換されている、請求項1記載の方法。

【請求項11】 アグルコンイソフラボン強化抽出物のpHを前記タンパク質のおおよその等電点に調節し、タンパク質及びアグルコンイソフラボンを含むタンパク質原料を沈殿させる、請求項1記載の方法。

【請求項12】 前記タンパク質原料の洗浄を避ける、請求項11記載の方法。

【請求項13】 前記タンパク質原料を沈殿タンパク質原料の重量の約6倍以下の重量の水で洗浄する、請求項11記載の方法。

【請求項14】 請求項1記載の方法で製造したアグルコンイソフラボン強化抽出物。

【請求項15】 請求項11記載の方法で製造したアグルコンイソフラボン強化タンパク質原料。

【請求項16】 植物性原料からアグルコンイソフラボン強化タンパク質原料を製造する方法であって、イソフラボン複合体及びタンパク質を含む植物性原料を、前記植物性原料中のタンパク質のおおよその等電点よりも高いpHの水性抽出溶媒で抽出する工程；温度約2℃～約121℃、pH約6～約13.5で、イソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換するのに十分な時間、水性抽出物を処理する工程；水性抽出物からイソフラボングルコシドを含むタンパク質原料を分離する工程、及びタンパク質原料中のイソフラボングルコシドを、温度約5℃～約75℃、pH約3～約9で、イソフラボングルコシドをアグルコンイソフラボンに転換するのに十分な時間、グルコシド結合を切断することができる酵素に接触させる工程を有する方法。

【請求項17】 前記抽出をpH約6～約10で達成する、請求項16記載の方法。

【請求項18】 前記水性抽出物を、pH約9～11、温度約5℃～約75℃で処理し、前記イソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換する請求項16記載の方法。

【請求項19】 イソフラボングルコシドを含むタンパク質原料を前記水性抽出物から分離する工程が、該水性抽出物のpHを、前記タンパク質原料のおおよその等電点に調整し、前記抽出物からタンパク質原料を沈殿させる、請求項16記載の方法。

【請求項20】 タンパク質原料中のイソフラボングルコシドを酵素に接触させる工程が、該タンパク質原料に有効量の追加の酵素を加えることを含む、請求項16記載の方法。

【請求項21】 前記追加の酵素が、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ酵素、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素、グルコアミラーゼ酵素、ペクチナーゼ酵素及びこれらの組み合わせである、請求項20記載の方法。

【請求項22】 追加の酵素を、前記タンパク質原料中の濃度が、乾燥基準で約0.1重量%～約10重量%となるようにタンパク質原料に加える、請求項20記載の方法。

【請求項23】 前記植物性原料が大豆原料である、請求項16記載の方法。

【請求項24】 イソフラボン複合体の大部分をアグルコンイソフラボンに転換する、請求項16記載の方法。

【請求項25】 実質的に全てのイソフラボン複合体がアグルコンイソフラボンに転換されている、請求項16記載の方法。

【請求項26】 請求項16記載の方法で製造したアグルコンイソフラボン強化タンパク質原料。

【請求項27】 植物性原料からアグルコンイソフラボン強化抽出物を製造する方法であって、タンパク質及び

(3)

特開平10-99089

3

イソフラボン複合体を含む植物性原料で水性スラリーを調製する工程；温度約2℃～約121℃、pH約6～約13.5で、イソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換するのに十分な時間、前記植物性原料のスラリーを処理する工程；前記植物性原料を、該植物性原料中の前記タンパク質のおおよその等電点を上回るpHの水性抽出溶媒で抽出する工程；及びグルコシド結合を切断できる酵素に、温度約5℃～約75℃、pH約3～約9で、イソフラボングルコシドをアグルコンイソフラボンに転換するのに十分な時間、前記水性抽出物中のイソフラボングルコシドを接触させる工程を有する方法。

【請求項28】 前記水性スラリーが、植物性原料を20重量%まで含む、請求項27記載の方法。

【請求項29】 抽出をpH約6～約10で行う、請求項27記載の方法。

【請求項30】 前記抽出物中のイソフラボングルコシドを酵素に接触させる工程において、有効量の追加の酵素を抽出物に加えることを含む、請求項27記載の方法。

【請求項31】 前記追加の酵素が、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ酵素、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素、グルコアミラーゼ酵素、ペクチナーゼ酵素及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれる、請求項30記載の方法。

【請求項32】 追加の酵素を前記抽出物に、乾燥重量ベースで植物性原料の約0.1%～約10%の濃度となるよう加える、請求項30記載の方法。

【請求項33】 前記植物性原料が大豆原料を含む、請求項27記載の方法。

【請求項34】 イソフラボン複合体の大部分がアグルコンイソフラボンに転換される請求項27記載の方法。

【請求項35】 実質的にほとんど全てのイソフラボン複合体がアグルコンイソフラボンに転換される請求項27記載の方法。

【請求項36】 請求項27記載の方法で製造されたアグルコンイソフラボン強化抽出物。

【請求項37】 さらにアグルコンイソフラボン強化抽出物のpHを、前記タンパク質のおおよその等電点に調整し、タンパク質及びアグルコンイソフラボンを含むタンパク質原料を沈殿させることを含む、請求項27記載の方法。

【請求項38】 請求項37記載の方法により製造したアグルコンイソフラボン強化タンパク質原料。

【請求項39】 植物性原料からアグルコンイソフラボン強化タンパク質原料を製造する方法であって、イソフラボン複合体及びタンパク質を含む植物性原料を、該植物性原料中の該タンパク質のおおよその等電点を上回るpHの水性抽出物で抽出する工程；イソフラボン複合体を含むタンパク質原料を該抽出物から分離し、該タンパク質原料の水性スラリーを調製する工程；温度約2℃～約121℃、pH約6～約13.5で、イソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換するのに十分な時間、前記水

4

性スラリーを処理する工程；及びグルコシド結合を切断できる酵素に、温度約5℃～約75℃、pH約3～約9で、イソフラボングルコシドをアグルコンイソフラボンに転換するのに十分な時間、前記水性スラリー中のイソフラボングルコシドを接触させる工程を有する方法。

【請求項40】 抽出をpH約6～約10で行う、請求項39記載の方法。

【請求項41】 該抽出物のpHを、前記タンパク質のおおよその等電点に調整し、前記抽出物からタンパク質原料を沈殿させる、抽出物から前記タンパク質原料を分離する請求項39記載の方法。

【請求項42】 前記水性スラリーがタンパク質原料を約30重量%まで含む請求項39記載の方法。

【請求項43】 前記水性スラリーをpH約9～約11、温度約5℃～約75℃で処理し、イソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換する請求項39記載の方法。

【請求項44】 水性スラリー中のイソフラボングルコシドを酵素に接触させる工程が、該スラリーに有効量の追加の酵素を加えることを含む、請求項39記載の方法。

【請求項45】 前記追加の酵素が、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ酵素、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素、グルコアミラーゼ酵素、ペクチナーゼ酵素及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれる、請求項44記載の方法。

【請求項46】 追加の酵素を前記水性スラリーに、乾燥重量ベースで植物性原料の約0.1%～約10%の濃度となるよう加える、請求項44記載の方法。

【請求項47】 前記植物性原料が大豆原料を含む、請求項39記載の方法。

【請求項48】 イソフラボン複合体の大部分がアグルコンイソフラボンに転換される請求項39記載の方法。

【請求項49】 実質的にほとんど全てのイソフラボン複合体がアグルコンイソフラボンに転換される請求項39記載の方法。

【請求項50】 請求項39記載の方法で製造されたアグルコンイソフラボン強化タンパク質原料。

【請求項51】 アグルコン強化植物性タンパク質原料から高ゲニステイン含有原料を回収する方法であって、アグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質原料を提供する工程；アグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質原料を抽出溶媒で抽出し、アグルコンイソフラボン強化抽出物を製造する工程、及び該抽出物を、該抽出物から高ゲニステイン含有ゲニステインを分離するのに十分な時間、吸着性物質に接触させる工程を含む方法。

【請求項52】 前記抽出溶媒が、アルコールを約30%～約90%含む水性アルコールである、請求項51記載の方法。

【請求項53】 前記抽出溶媒がアグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質原料中のタンパク質のおおよその等電点のpHを有する、請求項51記載の方法。

【請求項54】 アグルコンイソフラボン強化植物性タ

(4)

特開平10-99089

5

ンパク質原料を、抽出溶媒と該原料の重量比が約11:1を超えない場合に、抽出溶媒を用いて抽出する、請求項51記載の方法。

【請求項55】 該抽出物を、溶離剤を用いて吸着性物質を通し、抽出物中のゲンステインを吸着性物質に異なる放出性結合をさせ、該抽出物から高ゲンステイン含有原料を分離する、請求項51記載の方法の方法。

【請求項56】 前記高ゲンステイン含有原料が少なくともゲンステイン40%を含む、請求項51記載の方法。

【請求項57】 前記高ゲンステイン含有原料が少なくともゲンステイン90%を含む、請求項56記載の方法。

【請求項58】 さらに、抽出物から残留植物性タンパク質原料を除去することを含む、請求項51記載の方法。

【請求項59】 請求項51記載の方法で製造された高ゲンステイン含有原料。

【請求項60】 アグルコン強化植物性タンパク質原料から高ダイドゼイン含有原料を回収する方法であって、アグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質原料を提供する工程；抽出溶媒を用いてアグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質原料を抽出し、アグルコンイソフラボン強化抽出物を製造する工程；該抽出物を、該抽出物から高ダイドゼイン含有原料を分離するのに十分な時間、吸着性物質と接触させる工程を有する方法。

【請求項61】 前記抽出溶媒がアルコール約30%～約90%を含む水性アルコールである、請求項60記載の方法。

【請求項62】 前記抽出溶媒が、アグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質原料中の該タンパク質のおおよその等電点のpHを有する請求項60記載の方法。

【請求項63】 アグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質原料を、抽出溶媒と該原料の重量比が約11:1を超えない場合、抽出溶媒で抽出する請求項60記載の方法。

【請求項64】 該抽出物を、溶離剤を用いて吸着性物質を通し、該抽出物と吸着性物質とを接触させ、ダイドゼインを吸着性物質に異なる放出性結合をさせ、該抽出物から高ダイドゼイン含有原料を分離する、請求項60記載の方法の方法。

【請求項65】 高ダイドゼイン含有原料が少なくともダイドゼイン40%を含む、請求項60記載の方法。

【請求項66】 さらに抽出物から残留植物性タンパク質原料を除去することを含む、請求項60記載の方法。

【請求項67】 請求項60記載の方法で製造した、高ダイドゼイン含有物質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質抽出物、タンパク質原料、並びに植物性タンパク質原料中のイソフラボン複合体を、アグルコンイソフラボン、及び高ゲンステイン含有原料及

6

び高ダイドゼイン含有原料に転換する2工程プロセスを実施することにより、前記抽出物及び原料を提供する方法、及びアグルコンイソフラボン強化タンパク質原料から、これらを提供する方法に関するものである。

【0002】

【従来技術】 イソフラボンは、大豆のような植物性タンパク質原料を含む、様々な豆科植物によって作り出される。これらの化合物は、ダイドジン、6"-OAcダイドジン、6"-OMal ダイドジン、ダイドゼイン、ゲンスチン、6"-OAcゲンスチン、6"-OMal ゲニスチン、ゲンステイン、グリシチン、6"-OAc-グリシチン、6"-OMal グリシチン、グリシチン、ピオカニン A、フォルモノネンチン、及びコウメストロールがある。通常、これらの化合物は、大豆の固有の苦味と結合している。植物性タンパク質原料中のイソフラボン類は、イソフラボングルコシド（グルコン）、イソフラボン複合体及びアグルコンイソフラボンを含んでいる。イソフラボングルコシドはイソフラボン成分と結合したグルコースを有する。イソフラボン複合体は、イソフラボングルコシドのグルコース分子と結合した付加的成分を有する。例えば、6"-OAcゲンスチンはゲンスチンのグルコース分子の第6位に結合した酢酸基を有している。

【0003】 大豆は対応するグルコシド、複合体及びアグルコン：ゲンステイン族、ダイドゼイン族及びグリシチン族を有する3族のイソフラボン化合物を含んでいる。ゲンステイン族には、グルコシドゲンスチン、複合体6"-OMal ゲニスチン（ゲンスチンの6"-マロン酸エステル）及び6"-OAc ゲニスチン（ゲンスチンの6"-酢酸エステル）；及びアグルコンゲンステインがある。ダイドゼイン族には、グルコシドダイドジン、複合体6"-OMal ダイドジン及び6"-OAcダイドジン；及びアグルコンダイドゼインがある。グリシチン族には、グルコシドグリシチン、複合体6"-OMal グリシチン；及びアグルコングリシチンがある。植物性タンパク質分離物及び濃縮物のような市販製品の製造において、その焦点はこれらの物質をどのように除去するかである。例えば、大豆フレークを水性アルカリメジウムを抽出する、植物性タンパク質分離物又は濃縮物を製造する従来の方法において、大量のイソフラボンが、大豆タンパク質とともにその抽出物中に溶けている。該タンパク質は、その抽出物を酸性にすることにより、その抽出物から沈殿させ、分離して、分離物又は濃縮物を形成し、大量の溶解イソフラボンを残している乳清を残す。酸性沈殿タンパク質に残された残留イソフラボンは、通常、徹底した洗浄により除去する。該乳清及びその洗浄物を通常、捨てる。

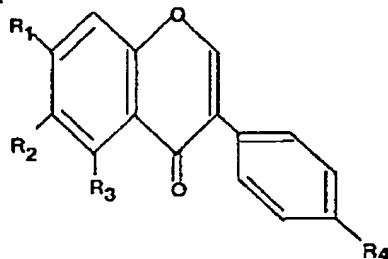
【0004】 最近、大豆のような植物性タンパク質に含まれるイソフラボンが医学的に価値があると認められている。すべてのイソフラボンに医学的な価値について関心がもたれているが、アグルコンが大部分関心をもたれている具体的なイソフラボンである。ゲンステイン及び

7

ダイドゼインが心臓の危険因子を有意に減らすのである  
う("Plant and Mammalian Estrogen Effects on Plasma  
Lipids of Female Monkeys", Circulation, 90 巻、  
1259頁(1994年10月))。また、ゲニステイン及びダイド  
ゼインは、更年期障害又は月経期症候群のような女性に  
おける、内生的なエストロゲンのレベルの減少又は変化  
によって起きる状態の症状を軽減すると考えられてい  
る。さらに、近年、アグルコンイソフラボン、乳ガン  
細胞及び前立腺ガン細胞のようなヒトガン細胞の成長を  
阻害し得ると認識されている。この点について次の論文  
に記載されている："Genistein Inhibition of the Gro  
wth of Human Breast Cancer Cells, Independence from  
Estrogen Receptors and the Multi-Drug Resistance  
Gene" by Peterson and Barnes, Biochemical and Biop  
hysical Research, Communications, 179 巻, 第1号,  
661-667 頁, 1991年8月30日; "Genistein and Biocha  
nin A Inhibit the Growth of Human Prostate Cancer  
Cells but not Epidermal Growth Factor Receptor Ty  
rosine Autophosphorylation" by Peterson and Barne  
s, The Prostate, 22 巻, 335-345 頁(1993年);及び "20  
Soybeans Inhibit Mammary Tumors in Models of Breas  
t Cancer" by Barnes, et al., Mutagens and Carcinog  
ens in the Diet, 239-253頁(1990年)。先に指摘した  
ように、該アグルコンイソフラボンは、ダイドゼイン、  
ゲニステイン及びグリシテインを含んでいる。これらの  
アグルコンは次の一般式を有する:

【0005】

【化1】



【0006】式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ はH、OH及びOCH<sub>3</sub>  
からなる群から選ぶことができる。ゲニステインは前  
記式中 $R_1$ =OH、 $R_2$ =H、 $R_3$ =OH、及び $R_4$ =OHであり、ダイド  
ゼインは前記式中、 $R_1$ =OH、 $R_2$ =H、 $R_3$ =H、及び $R_4$ =OHであり、  
かつグリシテインは前記式中、 $R_1$ =OH、 $R_2$ =OCH<sub>3</sub>、 $R_3$   
=H、及び $R_4$ =OHである。

【0007】したがって、本発明が関連するのは、植物  
性タンパク質抽出物のアグルコン及びその濃縮物、これ  
らの化合物を含む植物性タンパク質原料、及びまた高ゲ  
ニステイン含有原料及び高ダイドゼイン含有原料であ  
る。また、本発明はアグルコン強化植物性タンパク質抽  
出物、アグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質原  
料、高ゲニステイン含有原料及び高ダイドゼイン含有原

(5)

特開平10-99089

8

料に関するものである。植物性タンパク質イソフラボン  
複合体をアグルコンイソフラボンに転換する一般的方法  
は公知であり、かつ本件出願の譲受人が所有する、1995  
年6月7日出願の、現在継続中の米国特許出願第08/47  
7,102号により提供されている。グルコシドをアグルコ  
ンイソフラボンに転換する方法も公知である。イソフラ  
ボングルコシドをアグルコンイソフラボンに転換し、ア  
グルコンイソフラボン強化植物性タンパク質抽出物及び  
アグルコンイソフラボン強化分離物が、本件出願の譲受  
人が所有する、現在継続中の国際特許出願第PCT/US94/1  
0697号により提供されている。また、タバタらの日本国  
特許出願第258,669号に記載されているように、イソフ  
ラボングルコシドをアグルコンイソフラボンに転換する  
先行技術も公知である。このような方法は、イソフラボ  
ン複合体をアグルコンイソフラボンに転換すること、又  
はアグルコン強化植物性タンパク質分離物から誘導され  
た高ゲニステイン含有原料、又は高ダイドゼイン含有原  
料を提供しない。さらに、これらの方法は、グルコシド  
のアグルコンへの転換を中間的な程度で達成するだけで  
あり、この中間的な程度の転換を達成するのにかなりの  
時間が必要である。したがって、このような方法は、大規  
模な商業的操業にとり好ましいものではない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明の  
目的は、アグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質  
抽出物及びその製造方法を提供することである。さら  
に、本発明の目的は、アグルコンイソフラボン強化植物  
性タンパク質原料及びその製造方法を提供することであ  
る。また、さらに本発明の目的は、高ゲニステイン含有  
原料及び高ダイドゼイン含有原料及びアグルコンイソ  
フラボン強化植物性タンパク質原料から、それらを製造す  
る方法を提供するものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、アグルコンイ  
ソフラボン強化抽出物及びイソフラボン複合体及びタン  
パク質を含む植物性原料からこれらを製造する方法であ  
る。これらの方法は、イソフラボン複合体を含む植物性  
原料を、該植物性原料中のタンパク質のおよその等電点  
より上のpHを有する水性抽出溶媒で、抽出すること  
を含む。この水性抽出物を、所定の温度及びpHでイソフ  
ラボン複合体がイソフラボングルコシドに転換するのに  
十分な時間、処理する。酵素を、イソフラボングルコシ  
ドをアグルコンイソフラボンに転換し、アグルコンイソ  
フラボン強化抽出物を製造するのに十分な時間、所定の  
温度及びpHで、水性抽出物中でイソフラボングルコシ  
ドに接触させて、アグルコンイソフラボン強化抽出物を  
製造する。

【0010】本発明の実施態様において、該抽出をpH  
約6〜約10で行う。抽出溶媒と植物性タンパク質原料の  
重量比を、約8:1〜16:1とするのが好ましい。本発

9

明の他の実施態様において、イソフラボン複合体を、約 2℃～約 121℃の温度で、かつ pH 約 6～約 13.5 で、該水性抽出物を処理することにより、イソフラボングルコシドに転換する。この転換は pH 約 11、温度約 5℃～約 50℃で実施、または pH 約 9、温度 45℃～約 75℃で実施するのが好ましい。さらに、本発明の他の実施態様において、このイソフラボングルコシドを、温度約 5℃～75℃、pH 値約 3～約 9 で、水性抽出物中で酵素と接触させ、アグルコンイソフラボンに転換する。この酵素は、1,4-グルコシド結合を切断することができるサッカリダーゼ酵素であるのが好ましい。本発明の他の実施態様において、アグルコンイソフラボン強化抽出物の pH を、抽出物中のタンパク質のほぼ等電点に調節し、タンパク質及びアグルコンイソフラボンを含むタンパク質原料を沈殿させる。

【0011】イソフラボン複合体をイソフラボングルコシドにする、イソフラボングルコシドをアグルコンイソフラボンにする高転換速度が実現する。実施態様において、大多数及び好ましくは実質的にすべてのイソフラボン複合体は、アグルコンイソフラボンに転換される。他の側面において、本発明はアグルコンイソフラボン強化タンパク質原料及びイソフラボン複合体及びタンパク質を含む植物性原料から誘導されたイソフラボングルコシド強化タンパク質原料から、これらを製造する方法である。該植物性原料を、該植物性原料中のタンパク質のおよその等電点より高い pH を有する水性抽出溶媒で抽出する。イソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換するのに十分な時間、所定の温度及び pH で処理する。イソフラボングルコシドを含むタンパク質原料を該抽出物から分離し、かつタンパク質原料中の該イソフラボングルコシドをイソフラボングルコシドをアグルコンイソフラボンに転換するのに十分な時間、所定の pH 及び温度で酵素に接触させる。

【0012】さらに他の側面において、本発明はアグルコンイソフラボン強化抽出物、及びイソフラボン複合体及びタンパク質を含む植物性原料から誘導されたイソフラボングルコシド強化植物性原料から、これらを製造する方法である。植物性原料で水性スラリーを形成し、かつ該スラリーをイソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換するのに十分な時間、所定の pH 及び温度で処理する。次いで、該イソフラボングルコシド強化植物性原料を、該植物性原料中タンパク質のおよその等電点を上回る pH を有する水性抽出溶媒で抽出する。この抽出物中のイソフラボングルコシドを、イソフラボングルコシドをアグルコンイソフラボンに転換するのに十分な時間、所定の温度及び pH で酵素に接触させる。好ましい実施態様において、抽出物中のイソフラボングルコシドを、該抽出物に追加の酵素を加えることにより、酵素と接触させる。この場合、追加の酵素は、1,4-グルコシド結合を切断できるサッカリダーゼが好ましい。他の

(6)

特開平 10-99089

10

実施態様において、アグルコンイソフラボン強化抽出物の pH を、該タンパク質のおよその等電点に調整し、タンパク質及びアグルコンイソフラボンを含むタンパク質原料を沈殿させることにより、アグルコンイソフラボン強化タンパク質原料を、アグルコンイソフラボン強化抽出物から形成する。

【0013】さらに他の側面において、本発明はアグルコンイソフラボン強化タンパク質原料、及びイソフラボン複合体及びタンパク質を含む植物性原料から誘導した、タンパク質原料からこれらを製造する方法である。植物性原料を、該タンパク質のおよその等電点より上の pH を有する水性抽出溶媒を用いて抽出する。イソフラボン複合体を含むタンパク質原料を、タンパク質のおよその等電点に抽出物の pH を調節することにより、該抽出物から分離する。水性スラリーをタンパク質原料で形成し、該水性スラリーをイソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換するのに十分な時間、所定の pH 及び温度で処理する。スラリー中のイソフラボングルコシドを、所定の温度及び pH で、イソフラボングルコシドをアグルコンイソフラボンに転換するのに十分な時間、酵素に接触させる。

【0014】好ましい実施態様において、スラリー中のイソフラボングルコシドを、このスラリーに有効量の追加の酵素を加えることにより、酵素と接触させる。この場合、該追加の酵素は 1,4-グルコシド結合を切断できるサッカリダーゼ酵素であるのが好ましい。さらに他の側面において、本発明は高ゲニステイン含有原料、及びアグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質原料から、これらを回収する方法である。アグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質原料を提供し、水性アルコール抽出溶媒で抽出して、アグルコンイソフラボン強化抽出物を製造する。該抽出物を、該抽出物から高ゲニステイン含有原料を分離するのに十分な時間、吸着性物質と接触させる。最後の側面において、本発明は高ダイドゼイン含有原料、及びアグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質原料から、これらを製造する方法である。アグルコンイソフラボン強化植物性タンパク質原料を供給し、水性アルコール抽出溶媒を用いて、アグルコンイソフラボン強化抽出物を製造する。該抽出物を、該抽出物から高ダイドゼイン含有原料を分離するのに十分な時間、吸着性物質に接触させる。

【0015】好ましい実施態様の方法の出発原料は、イソフラボン複合体及び植物性タンパク質を含む、何らかの植物性タンパク質原料又は植物原料である。好ましい実施態様において、出発物質は大豆原料である。その理由は、この方法が、特に大豆原料からアグルコンイソフラボン強化抽出物及びタンパク質原料製造するのに適しているからである。本明細書中用いられる用語“大豆原料”は、大豆及び何らかのタイプの大豆誘導物を意味する。最も好ましい出発物質は、当業界における常法に従

(7)

特開平10-99089

11

い溶媒で抽出して油脂を除去した、大豆フレークである。この方法は、一般に、大豆又は大豆原料に加え、広範囲の植物性タンパク質物質に応用することができる。

【0016】イソフラボン複合体を含む植物性植物原料のタイプに依存して、若干の例において植物原料を処理して最終的な分割されて形態にすることが必要となるであろう。これは、植物性原料に含まれているイソフラボン化合物を、以下により詳細に説明する各種試薬に近づけるために望ましいであろう。この原料は、磨り潰す、破碎する又は他の当該技術分野で公知の常法で処理してもよい。この植物原料が、植物原料中のイソフラボン化合物に外部試薬又は反応物が容易に接近できる場合、この植物原料をこのような処理にかける必要はない。最初の工程又は操作において、イソフラボン複合体を含む植物性タンパク質及びイソフラボン化合物を、植物性タンパク質原料から抽出する。このフレークを、pHがタンパク質原料のおおよその等電点を上回る、好ましくはpHが約6.0～約10.0、かつpHが最も好ましくは約6.7～約9.7である水性抽出溶媒を用いて抽出する。必要ならば、通常、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム及び水酸化カルシウムのようなアルカリ性試薬を使用して、水性抽出溶媒のpHを上げることができる。所望のイソフラボン化合物及び植物性タンパク質は、該水性抽出物に溶ける。

【0017】水性抽出物中のこれらの化合物の回収を最大にするため、大豆フレーク又は他の植物性タンパク質原料と、抽出溶媒との重量比を特定の水準に制御し、できる限り植物性原料中のイソフラボンが多く溶けるようにするのが好ましい。タンパク質とイソフラボンの抽出は、好ましくは水性抽出溶媒と植物性タンパク質原料の重量比を約8:1～約16:1として、植物性タンパク質原料の向流を含む、従来の抽出方法で行うことができる。植物性タンパク質原料を抽出する際、該抽出溶媒はタンパク質及びイソフラボンの水性抽出物を提供する。この方法に代わり、2工程抽出法を用いることができる。この抽出法では、最初の抽出における、抽出溶媒と植物性タンパク質原料の重量比を約10:1とし、かつ第2の最初の抽出における、抽出溶媒と植物性タンパク質原料の重量比を約10:6以下とし、その結果、双方の抽出物における抽出溶媒と植物性タンパク質原料の合わせた重量比が、抽出溶媒と植物性タンパク質原料の総重量比が約16:1を超えない。また、他の抽出方法を、抽出溶媒と植物性タンパク質原料の重量比が約16:1以下して用いることができる。

【0018】最初のイソフラボン転換工程又は操作において、水性抽出物中のイソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換し、イソフラボングルコシド強化抽出物を製造する。この転換は水性抽出物のpH及び温度に依存することが見いだされている。イソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換するpHの範囲は、約6～13.5である。必要ならば、pHを上げなければならない

12

場合は、適当な塩基、苛性試薬、すなわち塩基性試薬を用いて、pHを下げなければならない場合は、適当な酸、すなわち酸性試薬を用いて、水性抽出物のpHを所望のpHに合わせなければならない。イソフラボン複合体からイソフラボングルコシドへの転換は塩基触媒で行うべきであることが見いだされており、その結果、高pHで、速やかな転換を達成することが最も好ましい。イソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換する、最も好ましいpHは約9～約11である。

【0019】イソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換する温度範囲は約2℃～約121℃である。容易にこの転換が起こる温度範囲は、水性抽出物のpHに依存する。発明者らは、pHが比較的高い場合、この転換が低い温度で容易に起きることを見いだした。例えば、pHが約11のとき、該転換は約5℃～約50℃の温度範囲で速やかかつ効率的に起きる。pHが約9のとき、該転換は約45℃～約75℃の温度範囲で効率的に起きる。水性抽出物のpHが比較的低い場合、該転換はより高い温度で起きる。例えば、pHが約6のとき、該転換は約80℃～約121℃の温度範囲で起きる。好ましい実施態様において、この転換は約35℃、pH約11で達成される。他の好ましい実施態様において、該転換は約73℃、pH約9で達成される。最初の工程においてイソフラボン複合体をイソフラボングルコシドに転換するのに必要な時間は、主として適用するpH及び温度範囲に依存する。このような転換にかかる時間は、通常約15分から数時間以上である。転換は高pH及び高温でより速やかに起こる。pH約9のとき、73℃で転換は約4時間～約6時間で実質的に完了する。最も好ましい実施態様において、イソフラボン複合体は、pH約11、温度約35℃において、約30分～約1時間、好ましくは約45分でイソフラボングルコシドに転換される。

【0020】最初の転換工程は水系で行うのが好ましい。低分子量アルコール及び他の水溶性溶媒のような他の水相溶性成分が、同様に系内に存在してもよい。この最初のイソフラボン転換工程は著しく効率的であり、イソフラボン複体の約80%～約100%をイソフラボングルコシドに転換する。前記の好ましい反応パラメータを使用することにより、95%以上の転換を達成する。これらの高転換速度は大規模な商業的操業にとり特に魅力的である。第2のイソフラボン転換工程又は操作において、最初の転換工程において生産されたイソフラボングルコシド（並びに水性抽出物に以前からあるイソフラボングルコシド）を、酵素反応によりアグルコンイソフラボンに転換する。該転換によりイソフラボングルコシド強化抽出物からアグルコンイソフラボン強化抽出物を製造する。

【0021】第2の転換工程は抽出物に存在する酵素の濃度及びその特性に依存することが見いだされた。該転換を達成するのに必要な酵素は、イソフラボン成分とイ



13

ソフラボングルコシドのグルコース分子の間のグルコシド結合を切断できる酵素である。好ましい実施態様において、この酵素は1,4-グルコシド結合を切断できる、サッカリダーゼ、エステラーゼ又はグルコアミラーゼ酵素である。イソフラボングルコシドをアグルコンイソフラボンに転換するために必要とされる酵素の濃度は、水性抽出物に存在する酵素のタイプ、酵素濃度の分布、酵素の活性、転換中の抽出物のpH及び温度を含む様々なファクターに依存する。該酵素は植物性タンパク質原料又は抽出物中の微生物生育いづれから、抽出物中にもともと存在し得る。このような生来存在する酵素を、本明細書中では"残留"酵素といい、抽出物に加えられた酵素を、本明細書中では"追加"の酵素という。

【0022】十分な酵素が抽出物に存在することでイソフラボングルコシドの少なくとも大部分、好ましくは実質的にすべてがアグルコンイソフラボンに転換される。一般に、抽出物中の残留酵素が転換を達成するために不十分である場合、追加酵素を抽出物に加えるべきである。好ましい実施態様において、十分な残留酵素が抽出物中にあるか否かにかかわらず、追加の酵素を抽出物に加える。その理由は、追加の酵素を加えることにより、グルコシドをアグルコンに実質的に完全な転換を達成するのに必要な時間を著しく少なくするからである。追加の酵素を加える場合、この追加の酵素を存在する酵素の総濃度が、乾燥重量ベースで植物性タンパク質原料の約0.1%〜約10%となるように加えなければならない。

【0023】追加の酵素は、選択されたpH及び温度条件での最適な活性、並びに費用効果に基づいて選択する。追加の酵素はイソフラボン成分と、イソフラボングルコシドのグルコシド分子の間の結合を切断できる酵素、例えば1,4-グルコシド結合を切断できるサッカリダーゼ、エステラーゼ、及びグルコアミラーゼ酵素である。好ましい追加の酵素には商業的に入手可能な、 $\alpha$ -及び $\beta$ -グルコシダーゼ酵素、 $\beta$ -カラクトシダーゼ酵素、グルコアミラーゼ酵素及びペクチナーゼ酵素がある。具体的に好ましい酵素を挙げると次のものがある：

Biopectinase 100L (pH約 3〜約 6で使用するのが好ましい。)

Biopectinase 300L (至適pH範囲約 3〜約 6)

Biopectinase OK 70L (至適pH範囲約 3〜約 6)

Biolactase 30,000 (至適pH範囲約 3〜約 6)

Neutral Lactase (至適pH範囲約 6〜約 8)

これらはすべてクエストインターナショナルから入手できる(Quest International, 1833 57th Street, Post Office Box 3917, Sarasota, Florida 34243)。また、特に好ましいものを挙げると次のものがある。

Lactase F (pH約 4〜約 6の範囲で使用するのが好ましい。)

Lactase 50,000 (至適pH範囲約 4〜約 6)

【0024】これらはインターナショナルエンザイムカ

(8)

特開平10-99089

14

ら入手できる(Amano International Enzyme Co., Inc., Post Office Box 1000, Troy, Virginia 22974)。他の具体的な好ましい追加の酵素には次のものがある。

G-Zyme G990 (至適pH約 4〜約 6)

Enzeco Fungal Lactase Concentrate (至適pH約 4〜約 6)

入手先: Enzyme Development Corporation (2 Penn Plaza, Suite 2439, New York, New York 10121)

Lactozyme 3000L (pH約 6〜約 8で使用するのが好ましい。)

$\alpha$ -Gal 600L (pH約 4〜約 6.5で使用するのが好ましい。)

入手先: Novo Nordisk Bioindustrials, Inc., (33 Turner Road, Danbury, Connecticut 06813)

Maxilact L2000 (pH約 4〜約 6で使用するのが好ましい。)

入手先: Gist Brocades Food Ingredients, Inc., (King of Prussia, Pennsylvania, 19406)

Neutral Lactase (pH約 6〜約 8で使用するのが好ましい。)

入手先: Pfizer Food Science Group, (205 East 42nd Street, New York, New York 10017)

【0025】イソフラボングルコシドをアグルコンイソフラボンに転換するpHの範囲は約3〜約9である。適用するpHは、主に使用する酵素のタイプに依存し、それに従って選択しなければならない。転換中の抽出物のpHはより低いと考えられているが、残留酵素は、pH7〜約9の範囲で活性である。追加の酵素は、幾つかの具体的な酵素について先に示したように、該酵素の製造者が特定する至適pHの範囲で活性である。通常、追加の酵素は、約6〜約8の中性pH領域、又は約3〜約6の酸性pH領域のいずれかにおいて活性である。pHを第2イソフラボン転換工程を実施するのに望ましい値に調整する。ほとんどの例において、酢酸、硫酸、リン酸、塩酸などの1種以上の適当な酸又はその他の適当な試薬を加えることにより、最初のイソフラボン転換工程の相対的に高い又は塩基性のpHを低くする。第2イソフラボン転換工程の温度範囲は約5℃〜約75℃である。該温度が酵素の活性に有効に影響し、したがって転換速度も影響を受ける。追加の酵素は70℃より高くとも活性であり得る、例えば、 $\alpha$ -Gal 600L は75℃で活性である。しかしながら、該転換はより低い温度で行い、酵素の失活を避けるのが好ましい。好ましい実施態様において、該転換は約35℃〜約45℃で達成される。

【0026】第2のイソフラボン転換工程で必要となる時間は、酵素関連ファクター、特に温度、及び系の温度とpHに依存する。ほとんどの例において、24時間以内に実質的に完全な転換を達成することができるが、追加の酵素を加えて、反応速度を著しく増加するのが好ましい。選択された追加の酵素、酵素濃度、pH及び温度が、

15

2時間以内、好ましくは1時間以内に実質的に完全な転換を起こさせるのが好ましい。この方法による転換の非常に高い水準は、抽出物中にあるイソフラボンの少なくとも大部分、好ましくは実質的にすべてを、アグルコン形態に転換する。この用語、“大部分”とはイソフラボングルコシドのアグルコンイソフラボンへの転換の範囲が少なくとも約50%の範囲であることをいう。用語“実質的にすべて”とは、イソフラボングルコシドのアグルコンイソフラボンへの転換の範囲が少なくとも約80%、及び最も好ましくは少なくとも約90%の範囲であることをいう。依存性基準に基づくこのように高い転換速度は注目すべきものであり、商業的応用に望ましいものである。

【0027】アグルコンイソフラボンタンパク質原料をアグルコンイソフラボン強化抽出物から回収することができる。第2のイソフラボン転換工程を完了する際に、必要ならば、酸を加えてpHを調整し、植物性タンパク質をおおよその等電点とする。大豆タンパク質で一般に約4.0～約5.0、かつ約4.4～約4.6が好ましい。タンパク質をpHを調節した抽出物からカードの形態で沈殿させる。アグルコンイソフラボンの有効な部分はカードに捕らえられている。沈殿に続き、該カード又は沈殿タンパク質を抽出物から分離し、アグルコンイソフラボンに富むタンパク質原料を形成する。アグルコンイソフラボン強化タンパク質原料を、遠心分離又は濾過により、前記抽出物から分離するのが好ましい。最も好ましい実施態様において、該タンパク質原料からアグルコンイソフラボンが除去されるのを実質的に減らすため、分離されたタンパク質原料の洗浄を完全に避けるか、又は最小限にする。したがって、水を用いたタンパク質原料の洗浄を完全に避けるか、又は、水とタンパク質原料の重量比が、約2:1～約6:1である間に、水で一回洗浄するよう限定するのがよい。例え、イソフラボンの回収が少なくなってもさらに洗浄を行うことができるけれども、沈殿したカードの洗浄をしないことにより、望ましい水準のイソフラボンを含むタンパク質原料が得られる。

【0028】分離したタンパク質原料を、遠心分離又は濃縮、又はこれらを組み合わせて脱水することができ、常法で乾燥する。遠心分離及び噴霧乾燥のような従来の脱水及び乾燥技術により乾燥タンパク質原料を形成するのが好ましいけれども、好ましい実施態様では脱水の具体的手段により限定すること意図していない。前記好ましい実施態様の方法で、抽出物を得た後、最初及び第2のイソフラボン転換工程を直ちに用いる。また、本発明は方法を含み、その方法においては、イソフラボン複合体及びタンパク質を含む植物性原料を、該タンパク質のほぼ等電点より上のpHを有する水性抽出溶媒で抽出し、最初のイソフラボン転換工程を抽出物に対して行い、イソフラボングルコシドを含むタンパク質原料を該抽出物から分離し、かつ第2のイソフラボン転換工程を該タンパ

(9)

10

20

30

40

50

特開平10-99089

16

ク質原料について実施する。この方法の工程は、先に記載した同じ一般的方法で実施することができる。

【0029】本発明は、さらに方法を含み、この方法では、イソフラボン複合体及びタンパク質を含む植物性原料で水性スラリーを調製し、その最初のイソフラボン転換工程を該水性スラリーに対し行い、該植物性原料を、該タンパク質のおおよその等電点より高いpHの水性抽出溶媒を用いて抽出し、かつ第2のイソフラボン転換工程を抽出物中のイソフラボングルコシドについて行う。植物性原料の水性スラリーが植物性原料を20重量%まで含むのが好ましい。この方法の工程を前記の同じ一般的方法で実施することができる。さらに、アグルコンイソフラボンを含むタンパク質原料を、前記の方法で行う第2イソフラボン転換工程の後、抽出物から分離することができる。また、本発明が含む方法は、イソフラボン複合体及びタンパク質を含む植物性タンパク質原料を、該タンパク質のおおよその等電点を上回るpHの水性溶媒を用いて抽出し、イソフラボン複合体を含むタンパク質原料を抽出物から分離し、水性スラリーをタンパク質原料から形成し、かつ最初及び第2イソフラボン転換工程をタンパク質原料の水性スラリーについて実施する。タンパク質原料の水性スラリーは、タンパク質原料を30重量%まで含むのが好ましい。この方法の工程は、先に記載したのと同じ一般的方法で実施することができる。

【0030】最初及び第2のイソフラボン転換工程を、イソフラボン複合体及びタンパク質を含む植物性原料の水性スラリー、このような植物性原料の抽出物及びこのような抽出物から分離したタンパク質原料について行う。本発明は、前記工程をいずれかを組み合わせて、アグルコンイソフラボン強化抽出物又はタンパク質原料を調製することを含む。高ゲニステイン含有原料及び高ダイドゼイン含有原料を回収したアグルコンイソフラボン強化原料から製造することができる。本明細書中で使用されているように、高ゲニステイン含有原料は、残留植物性原料とともに、少なくともゲニステインを少なくとも40%含む、最も好ましくはゲニステインを少なくとも90%含む植物性原料と定義する。この高ゲニステイン含有原料が大豆原料から回収されたものである場合、この残留植物性原料は残留大豆原料である。高ダイドゼイン含有原料は、残留植物性原料とともに、少なくとも40%のダイドゼインを含む。この高ダイドゼイン含有原料が大豆原料から回収されたものである場合、この残留植物性原料は大豆原料である。

【0031】アグルコンイソフラボン強化タンパク質原料を最初に洗浄し、望ましくない塩類及び糖類を除去してもよい。この水がタンパク質原料に対し6:1までの割合の場合、該アグルコンイソフラボン強化タンパク質に水を混ぜる。該水を冷却し、水におけるアグルコンイソフラボンの溶解度を最小にする。この水は約5℃～約30℃の温度である。このタンパク質原料を水と約15～30

(10)

特開平10-99089

17

分間混合し、次いでこのタンパク質原料を従来の濾過手段を用い、好ましくはこの混合物を通常の濾紙で濾過し、水から濾別する。所望ならば、この洗浄及び濾過工程を避けて、水洗浄におけるアグルコノイソフラボンの潜在的な損失を最小にすることができる。次いで、このアグルコノイソフラボン強化タンパク質原料を水性アルコール抽出溶媒を用いて抽出し、タンパク質原料からアグルコノイソフラボンを除去し、かつアグルコノイソフラボン抽出物を製造することができる。メタノール及び特にエタノールのような低分子量アルコールを抽出溶媒のアルコール成分とするのが好ましい。アグルコノイソフラボンは、抽出溶媒のほとんどすべてのアルコール濃度において可溶性であることが見いだされている。抽出溶媒がアルコールを約30%～約90%の範囲で、特に約60%～約80%の範囲で含む場合に、該アグルコノイソフラボンは特に可溶性である。水性アルコールは好ましい溶媒であるが、水、アセトニトリル、メチレンクロライド、アセトン及び酢酸エチルを含む他の溶媒を使用し、タンパク質原料からアグルコノイソフラボンの抽出を行うことができる。

【0032】この抽出物は最小量の抽出溶媒を使用して行う。抽出溶媒とアグルコノイソフラボン強化タンパク質原料の重量比が11:1を超えないのが好ましい。この抽出は、向流抽出を含む従来の抽出法、組み合わせた抽出物とタンパク質原料の重量比が11:1を超えない場合は、二重抽出により行うことができる。好ましい実施態様において、抽出溶媒とタンパク質原料の重量比が約6:1である場合、該タンパク質原料を最初に約80%エタノールにより抽出する。該抽出溶媒を、タンパク質原料を遠心分離器又は圧搾濾過器のような従来の分離手段により分離し、これを回収する。抽出溶媒とタンパク質原料の重量比が約4:1である場合、該タンパク質原料を再び80%エタノールで抽出する。該抽出溶媒を再び回収し、かつ最初に回収された抽出物に加える。次いで、水とタンパク質原料の重量比が約4:1である場合、該タンパク質原料を水フラッシュで洗浄し、かつ水を回収された抽出物に加える。

【0033】抽出はいかなるpHでも行うことはできるが、抽出溶媒がpH約7～約10であるのが好ましい。タンパク質ゲル形成を好ましいpH範囲内で避け、かつタンパク質原料を、アグルコノイソフラボン抽出物と同様に回収すべき場合、該タンパク質原料内に望ましくないアミノ酸福生物が形成されることを、好ましいpH範囲内で避ける。該抽出は、抽出溶媒の沸点までのいずれの温度でも行うことができるが、約25℃～約70℃で行うのが好ましい。タンパク質原料からアグルコノイソフラボンを最大限除去するため、この抽出を約50℃～約70℃、最も好ましくは約60℃の温度で行うのが好ましい。この抽出に続き、高ゲニステイン含有原料及び高ダイドゼイン含有原料を、該抽出物を吸着物質と、該抽出物から高ゲニ

18

テイン及び高ダイドゼイン含有原料を分離するのに十分な時間、接触させることにより、アグルコノイソフラボン抽出物から分離することができる。好ましい実施態様において、高ゲニステイン及び高ダイドゼイン含有原料を逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で、抽出物から分離する。ゲニステイン及びダイドゼインを、吸着物質の粒子を通して抽出物を溶出することにより、抽出物中の他のイソフラボン及び不純物から分離する。この吸着物質は、ゲニステイン、ダイドゼイン、他のイソフラボン及び不純物を化合物特異的な様式で放出可能な結合をし、これにより各化合物を分離することが可能になる。

【0034】アグルコノイソフラボン抽出物を最初に濾過し、HPLCカラムを詰まらせる不溶性物質を除去する。この抽出物を従来の濾過法により濾過してもよい。該抽出物を、また抽出物に含まれ得る残留タンパク質を除去する従来の限外濾過法で濾過するのが最も好ましい。HPLCカラムを通常の商業的に入手できるHPLCカラムに粒状の吸着性物質を充填することにより調製する。この吸着性物質は、ゲニステイン、ダイドゼイン、他のイソフラボン及び不純物を化合物特異的な様式で放出可能な結合をする。該吸着性物質は、どのようなHPLC充填物質であってもよいが、好ましい充填物質を、充填性能、分離効率及び値段を基準として選択することができる。このような好ましい充填物質には、Kromasil C18 16  $\mu\text{m}$  100 Å ピーズがある(入手先: Eka Nobel, Nobel Industries, Sweden)。濾過した抽出物を、充填HPLCカラムの結合部位がすべてイソフラボンで完全に飽和されるまで該カラムに通す。この飽和はカラムからの溶出液中にイソフラボンが見いだされることにより検出される。次いで、該HPLCカラムを極性溶離剤を用いて溶離し、分離を達成する。好ましい実施態様において、該溶離剤は、水性アルコールである。該水性アルコール溶離剤をアルコール含有量約30%～約90%、好ましくはアルコール含有量50%とし、イソフラボンの良好な分離と溶解を達成する。該アルコールはメタノール又はエタノールであるのが好ましく、高ゲニステイン又は高ダイドゼイン含有製品原料を食品又は薬品に使用する場合、エタノールが好ましい。

【0035】高ゲニステイン及び高ダイドゼイン含有原料をカラム溶出液から回収する。ダイドゼインを含む溶出液の画分がカラムから最初に溶出し、次いでグリシテイン画分が溶出し、より極性のゲニステイン画分がこれに続く。ダイドゼイン及びゲニステイン画分を、これらがカラムから溶出するに伴い回収する。また、所望ならば、グリシテイン画分を回収する。高ゲニステイン及び高ダイドゼイン含有原料及び高グリシテイン含有原料が、遠心分離又は濾過のような従来の分離法で回収できるようになった後で、画分中のアルコールを蒸発により除去してもよい。回収された高ゲニステイン含有原料は

(11)

特開平10-99089

19

20

少なくとも40%のゲニステイン、好ましくは少なくとも90%のゲニステインを残留植物性物質とともに含む。ゲニステインを大豆乳清から回収した場合、該植物性物質は残留大豆物質である。回収された高ダイドゼイン含有原料は残留植物性物質とともに、少なくとも40%のダイドゼインを含む。本発明を、植物性原料して大豆原料を用い、下記の実施例によりさらに詳細に示す。該実施例は詳細に説明することを意図するものであって、いかなる場合であっても本発明の範囲を制限し、又は他の限定を意図するものと解釈してはならない。

## 【0036】

【実施例】先に示したように、大豆原料は、対応するグルコシド、複合体及びアグルコンを有するイソフラボンのゲニステイン、ダイドゼイン及びグリシテイン族を含んでいる。ここでゲニステイン族は、複合体 6"-OMalゲニスチン及び 6"-OAc ゲニスチン、グルコシドゲニスチン及びアグルコンゲニステインを含んでおり、ダイドゼイン族は、複合体 6"-OMalダイドジン及び 6"-OAc ダイドジン、グルコシドダイドジン及びグルコンダイドゼインを含んでおり、かつグリシテイン族は複合体 6"-OMalグリシチル、グルコシドグリシチン及びアグルコングリシテインを含んでいる。次の表において、イソフラボンの相対濃度をイソフラボン族のパーセンテージとして測定し、示した。例えば、ゲニステイン族において、%ゲニステイン + % 6"-OMalゲニスチン + % 6"-OAc ゲニスチン + %ゲニステイン = 100%である。複合体からグル

表1

\* コシドへの、及びグルコシドからアグルコンへの転換の程度を、イソフラボン族における各タイプの化合物のパーセンテージと比較することにより測定することができる。

【0037】（実施例1）最初の実験では、大豆抽出物においてイソフラボン複合体からイソフラボングルコシドの転換を試験した。転換の程度を、イソフラボン族のグルコシドのパーセンテージの量的増加を伴う、同じイソフラボン族のマロン酸エステル及び酢酸エステルのパーセンテージの量的な減少により測定した。大豆抽出物を、細かく粉碎した脱脂大豆400gを水4000gを用いてスラリー化することにより製造した。水酸化ナトリウムを用いてpHを9.7に調整し、該スラリーを攪拌しながら38℃で15分間加熱した。次いで、該スラリーを遠心分離し、該抽出物を上清として回収した。イソフラボン複合体からイソフラボングルコシドへの転換を異なるpH及び温度条件で試験した。抽出物試料600gを塩酸又は水酸化ナトリウムを用いてpH6、7、9及び11に調整した。試料600gを各pH毎に300g試料2個に分け、かつこれらの試料を45℃、及び72.5℃で24時間インキュベートした。各試料について0、2、4、6及び24時間経過時に定期的に分析を行い、試料中のイソフラボン含有量を測定した。下記表1はそれぞれの実験途中のイソフラボンの変化及び分布を示している。

## 【0038】

【表1】

(結果はパーセンテージで表す。)						
試料	ゲニスチン	6"-OMALゲニスチン	6"-OACゲニスチン	ゲニスチン	ダイドジン	6"-OMALダイドジン
<u>pH 6, 45℃</u>						
t=0	44	47	0	13	35	48
t=10分	42	49	0	9	39	49
t=2 時間	29	51	0	19	27	49
t=4 時間	25	50	0	25	22	49
t=6 時間	23	50	0	27	19	48
t=24時間	15	43	1	40	12	42
<u>pH 7, 45℃</u>						
t=0	44	47	0	13	35	48
t=10分	43	48	0	9	40	48
t=2 時間	38	48	0	13	35	48
t=4 時間	37	47	0	16	32	47
t=6 時間	36	46	0	18	31	46
t=24時間	18	42	0	39	13	41
<u>pH 9, 45℃</u>						
t=0	44	47	0	13	35	48
t=10分	46	46	0	8	43	46
t=2 時間	51	41	0	8	49	40

(12)						特開平10-99089
21			22			
t=4 時間	57	36	0	7	54	35
t=6 時間	60	33	0	7	58	31
t=8 時間	58	26	0	15	55	25
<u>pH 11. 45℃</u>						
t=0	44	47	0	13	35	48
t=10分	73	20	0	8	71	19
t=2 時間	92	0	0	7	91	0
t=4 時間	93	0	0	7	90	0
t=6 時間	93	0	0	7	90	0
t=24時間	95	0	0	5	87	0
<u>pH 6. 72.5℃</u>						
t=0	44	47	0	13	35	48
t=10分	42	48	0	9	40	48
t=2 時間	50	41	0	9	47	40
t=4 時間	56	34	0	9	53	34
t=6 時間	61	30	0	9	58	29
t=24時間	84	7	0	9	80	6
<u>pH 7. 72.5℃</u>						
t=0	44	47	0	13	35	48
t=10分	45	40	0	9	41	47
t=2 時間	54	21	0	8	50	38
t=4 時間	61	11	0	8	58	30
t=6 時間	67	6	0	8	63	25
t=24時間	90	0	0	5	85	4
<u>pH 9. 72.5℃</u>						
t=0	44	47	0	13	35	48
t=10分	53	40	0	7	50	39
t=2 時間	73	21	0	6	70	20
t=4 時間	83	11	0	6	80	10
t=6 時間	88	6	0	5	85	6
t=24時間	96	0	0	4	91	0
<u>pH 11. 72.5℃</u>						
t=0	44	47	0	13	35	48
t=10分	89	3	0	8	87	3
t=2 時間	94	0	0	6	90	0
t=4 時間	94	0	0	6	87	0
t=6 時間	94	0	0	6	86	0
t=24時間	95	0	0	3	78	0

【0039】

\* \* 【表2】

表1 (続き)

(結果はパーセンテージを表す。)

試料	6"-OAC		6"-OMAL		
	ダイド ジン	ダイド ゼイン	グリシ チン	グリシ チン	ダリシ ティン
<u>pH 6. 45℃</u>					
t=0	1	16	40	37	23
t=10分	1	11	41	37	22
t=2 時間	1	22	37	36	27
t=4 時間	1	28	36	35	29

(13)

特開平10-99089

23

24

t=6 時間	1	31	35	35	30
t=24時間	0	46	30	32	37
<u>pH 7. 45℃</u>					
t=0	1	16	40	37	23
t=10分	1	11	42	36	22
t=2 時間	1	16	40	37	23
t=4 時間	1	20	41	36	23
t=6 時間	1	22	41	35	24
t=24時間	0	46	31	34	35
<u>pH 9. 45℃</u>					
t=0	1	16	40	37	23
t=10分	1	10	45	33	23
t=2 時間	1	10	49	30	21
t=4 時間	1	10	52	27	21
t=6 時間	0	10	54	25	21
t=8 時間	0	20	50	23	27
<u>pH 11. 45℃</u>					
t=0	1	16	40	37	23
t=10分	0	10	62	19	19
t=2 時間	0	9	82	0	18
t=4 時間	0	10	82	0	18
t=6 時間	0	10	81	0	19
t=24時間	0	13	78	0	22
<u>pH 6. 72.5℃</u>					
t=0	1	16	40	37	23
t=10分	1	12	40	35	24
t=2 時間	1	12	47	29	24
t=4 時間	1	12	52	23	24
t=6 時間	2	12	53	23	25
t=24時間	2	12	66	5	29
<u>pH 7. 72.5℃</u>					
t=0	1	16	40	37	23
t=10分	1	11	43	36	22
t=2 時間	1	10	47	30	23
t=4 時間	1	10	52	24	24
t=6 時間	1	10	56	20	24
t=24時間	1	9	68	4	28
<u>pH 9. 72.5℃</u>					
t=0	1	16	40	37	23
t=10分	1	10	47	31	22
t=2 時間	0	9	58	22	20
t=4 時間	0	9	67	14	19
t=6 時間	0	9	73	8	19
t=24時間	0	9	80	0	20
<u>pH 11. 72.5℃</u>					
t=0	1	16	40	37	23
t=10分	0	9	79	3	18
t=2 時間	0	10	81	0	19
t=4 時間	0	13	75	3	22
t=6 時間	0	14	74	3	23

(14)

特開平10-99089

25

26

t=24時間 2 20 70 4 27

【0040】6"-OMal and the 6"-OAcイソフラボン複合体化合物の相対濃度の低下、及びグルコシド、ゲニスチン、ダイドジン及びグリシチンの対応する濃度増加により示されているように、最初の工程は、より高い塩基性pH条件及び高温において最も速く、かつ完全である。イソフラボン複合体からイソフラボングルコシドへの実質的に完全な転換は、pH 9及びpH 11の試料において45℃と72.5℃の双方において起きるが、ダイドジン及びグリシチンはpH 11、72.5℃で劣化する。また、転換はpH 6及び7の試料において72.5℃で完全に近いまで進む。イソフラボン複合体からイソフラボングリシチンへの転換が、そのような条件下で特に効果的なわけではないが、前記抽出物の残留酵素によるイソフラボングリシチンからアグルコンイソフラボンへの実質的な転換は、pH 6及び7の試料において45℃で進む。

【0041】（実施例2）第2の実験において、イソフラボングリシチンからアグルコンイソフラボンへの転換を実験した。転換の程度を、イソフラボン族のグルコシドのパーセンテージの量的減少を、同じイソフラボン族のアグルコンのパーセンテージの対応する量的増加に\*

表2

\*より測定した。イソフラボングルコシド強化抽出物を、大豆フレークから、大豆抽出物のpHを約11、温度を約35℃に調節し、1時間かけて製造した。最初の試料において、イソフラボングルコシドからアグルコンイソフラボンへの転換は、イソフラボングルコシド強化抽出物中にある残留酵素を用い、試料のpHを7.0及び9.0に調節し、試料の温度を45℃に24時間保つことにより達成した。イソフラボングルコシドからアグルコンイソフラボンへの転換を追加の酵素を用い、イソフラボングルコシド強化抽出物の試料に加えることにより行った。ここで用いたのは商業的に入手できる次の追加の酵素である：Biolactase 30,000, Quest Neutral Lactase, Lactase 50,000, Biopectinase 100L, 及び $\alpha$ -Gal 600。各試料に加えた酵素の量を表2に示した。各試料を追加の酵素が活性であるpH 4.0、4.5又は7.0のいずれかに調整した。同じ試料を温度35℃～75℃でインキュベートした。試料を選択した時間処理し、イソフラボン含有量を測定した。

【0042】

【表3】

(結果はパーセンテージで表す。)

試料	ゲニス チン	6"-OMAL ゲニス チン	6"-OAC ゲニス チン	ゲニス ティン	ダイド ジン	6"-OMAL ダイド ジン
<u>残留酵素 pH 7.0, 45℃</u>						
t=0	94	1	1	5	93	1
t=3 時間	94	1	1	5	93	1
t=6 時間	84	1	1	14	86	1
t=24時間	29	1	1	69	42	2
<u>残留酵素 pH 9.0, 45℃</u>						
t=0	94	1	1	5	93	1
t=3 時間	93	1	1	5	94	1
t=6 時間	93	1	1	5	94	1
t=24時間	0	1	0	99	1	1
<u>Lactase 50,000, pH 4.0, 50℃</u>						
<u>0.12g/100g 抽出物</u>						
t=0	100	0	0	0	100	0
t=1 時間	6	0	0	94	30	0
<u>Biolactase 30,000, pH 4.5, 35℃</u>						
<u>0.05g/100g 抽出物</u>						
t=0	93	4	0	4	93	3
t=1 時間	26	4	0	70	16	3
t=2 時間	10	4	0	85	4	3
t=3 時間	5	4	0	91	0	3
<u><math>\alpha</math>-Gal 600, pH 4.5, 75℃</u>						
<u>10g/100g 抽出物</u>						
t=0	91	0	0	9	89	0

(15)						特開平 10-99089
27						28
t=24時間	1	0	0	99	0	0
<u>Biopectinase 100L, pH 4.0, 50°C</u>						
<u>0.2g/100g 抽出物</u>						
t=0	100	0	0	0	100	0
t=1 時間	67	0	0	33	58	0
<u>Quest Neutral Lactase, pH 7.0, 35°C</u>						
<u>0.05g/100g 抽出物</u>						
<u>pH 4.5</u>						
t=0	93	4	0	4	93	3
t=1 時間	66	4	0	30	66	3
t=2 時間	50	4	0	46	51	3
t=3 時間	36	4	0	59	37	3
t=24時間	1	4	0	95	0	3

【表 4】

表 2 (続き)

(結果はパーセンテージを表す。)					
試料	6"-OAC		6"-OMAL		
	ダイド チン	ダイド ゼイン	グリシ チン	グリシ チン	ダリシ ティン
<u>残留酵素, pH 7.0, 45°C</u>					
t=0	0	6	75	2	23
t=3 時間	0	6	75	2	22
t=6 時間	1	13	73	3	24
t=24時間	2	54	45	3	53
<u>残留酵素, pH 9.0, 45°C</u>					
t=0	0	6	75	2	23
t=3 時間	0	6	74	2	24
t=6 時間	0	6	74	2	24
t=24時間	4	93	18	5	77
<u>Lactase 50,000, pH 4.0, 50°C</u>					
<u>0.12g/100g 抽出物</u>					
t=0	0	0	100	0	0
t=1 時間	0	70	40	19	41
<u>Biolactase 30,000, pH 4.5, 35°C</u>					
<u>0.05g/100g 抽出物</u>					
t=0	0	5	100	0	0
t=1 時間	0	80	40	0	60
t=2 時間	0	92	26	0	74
t=3 時間	0	97	19	0	81
<u><math>\alpha</math>-Gal 600, pH 4.5, 75°C</u>					
<u>10g/100g 抽出物</u>					
t=0	0	11	78	0	22
t=24時間	2	98	0	0	100
<u>Biopectinase 100L, pH 4.0, 50°C</u>					
<u>0.2g/100g 抽出物</u>					
t=0	0	0	100	0	0
t=1 時間	0	42	87	13	0
<u>Quest Neutral Lactase, pH 7.0, 35°C</u>					
<u>0.05g/100g 抽出物</u>					
<u>pH 4.5</u>					



(16)

特開平10-99089

29					30
t=0	0	5	100	0	0
t=1 時間	0	31	77	0	23
t=2 時間	0	46	67	0	33
t=3 時間	0	59	58	0	42
t=24時間	0	97	0	0	100

【0043】ゲニスチン、ダイドジン及びグリシチンをゲニステイン、ダイドゼイン及びグリシチンにそれぞれ転換することで示されているように、イソフラボングルコシドからアグルコンイソフラボンへの実質的に完全な転換が達成される。選択された追加の酵素は、抽出物中の残留酵素による転換と比べ、その転換速度を著しく速くし、所定の有効濃度、温度及びpHにおいて実質的に完全な転換を1時間以内に達成する。

(実施例3) 他の実験において、アグルコンイソフラボン強化タンパク質原料を、アグルコンイソフラボン強化抽出物から回収し、かつ従来のタンパク質原料を従来の抽出物から回収した。各抽出物の回収されたタンパク質原料におけるイソフラボン含有量を、分離pH4.0、4.5及び5.0で測定した。

【0044】アグルコンイソフラボン強化大豆抽出物を次のように製造した。1)脱脂大豆フレークを水性アルカリ溶液を用いて抽出し、2)抽出物のpHを11にし、かつ抽出物を35℃に1時間保ち、イソフラボングルコシド強化\*

\* 抽出物を製造し、3)イソフラボングルコシド強化抽出物中の固形分の0.1重量%のLactase 50,000 (Amano International Enzyme Co.)を抽出物に加え、次いで約50℃、pH4.5で1時間処理し、アグルコンイソフラボン強化抽出物を製造した。また、従来の大豆抽出物を製造した。ここで従来の抽出物を脱脂大豆を水性アルカリ溶液を用いて抽出物することにより製造した。固形分10gを含む試料を各抽出物から得て、各抽出物からの試料をpH4.5に調整した。タンパク質原料を各試料を遠心分離することにより、各試料から分離し、次いで、各試料から分離したタンパク質原料のイソフラボン含有量を測定した。下記表3に、各試料中の総イソフラボン含有量をミリグラム及び各試料中のタンパク質原料に存在するイソフラボン族のイソフラボンの各タイプのパーセンテージで示した。

【0045】

【表5】

表3

(結果はパーセンテージで表す。)

試料	6"-OMAL		6"-OAC		6"-OMAL	
	ゲニスチン	ゲニスチン	ゲニスチン	ゲニスチン	ダイドジン	ダイドジン
アグルコンイソフラボン強化タンパク質原料	分離 pH 4.5					
タンパク質	1.4	0.0	0.0	9.7	0.0	0.0
従来のタンパク質原料	分離 pH 4.5					
タンパク質	1.6	4.3	0.0	1.6	0.7	2.3
アグルコンイソフラボン強化タンパク質原料	分離 pH 4.5					
タンパク質	13	0	0	87	0	0
従来のタンパク質原料	分離 pH 4.5					
タンパク質	21	58	0	21	16	55

【0046】

※ ※ 【表6】

表3 (続き)

(結果はパーセンテージを表す。)

試料	6"-OAC		6"-OMAL		
	ダイドチン	ダイドゼイン	グリシチン	グリシチン	ダリシチン
アグルコンイソフラボン強化タンパク質原料	分離 pH 4.5				
タンパク質	0.0	5.8	0.4	0.0	0.5
従来のタンパク質原料	分離 pH 4.5				
タンパク質	0.0	1.2	0.0	0.4	0.4
アグルコンイソフラボン強化タンパク質原料	分離 pH 4.5				
タンパク質	0	100	49	0	51
従来のタンパク質原料	分離 pH 4.5				
タンパク質	0	28	0	52	48

(17)

特開平10-99089

31

32

【0047】アグルコンイソフラボン強化抽出物から得たタンパク質原料と従来の抽出物から得たタンパク質原料のイソフラボン含有量を比較すると、アグルコンイソフラボン強化抽出物から得たタンパク質が、従来の抽出物から得たタンパク質原料よりも、アグルコンイソフラボン、特にゲニステイン及びダイドゼインの含有量が有意に高いことが見いだされる。従来の抽出物から得たタンパク質原料は、アグルコンイソフラボン強化タンパク質原料に存在しないイソフラボン複合体をかなりの量含んでいる。これはアグルコンイソフラボン強化抽出物におけるイソフラボン複合体のアグルコンイソフラボンへの転換に起因するものである。前記の例において、6"-O-Mal-ゲニステイン、6"-OAc-ゲニステイン、6"-O-Mal-ダイドジン、6"-OAc-ダイドジン、グリシチン、6"-O-Mal-グリシチン及びグリシチンは計算値である。示されているパーセンテージ又は酵素濃度は各試料における固形分100g当たりの市販の酵素配合物のグラム数から計算したものである。次に大豆製品中のイソフラボンを定量する方法について記載する。該イソフラボンを大豆製品から試料（噴霧乾燥又は微細粉末）0.75gを80/20メタノール/水溶媒50mlと混合することにより抽出した。この混合物を、オービタル振盪器を用いて室温で2時間攪拌した。2時間後、残留不溶性物質をワットマン42番濾紙を通して濾過することにより除去した。濾液5mlを水4mlとメタノール1mlで希釈した。

【0048】抽出されたイソフラボンを、Hewlett Packard C18 ハイパーシル逆相カラムを用い、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）で分離した。前記イソフラボン\*

\*をカラム上に注入し、メタノール88%、水10%及び氷酢酸2%で開始し、メタノール98%及び氷酢酸2%で終了する勾配のある溶媒を用いて溶出した。流速0.4ml/分で下記の成分を明瞭に分離した：全てのイソフラボン類-ゲニステイン、6"-O-アセチルゲニステイン、6"-O-マロニルゲニステイン、ゲニステイン、ダイドジン、6"-O-アセチルダイドジン、6"-O-マロニルダイドジン、グリシチン及びその誘導体、グリシチンである。ピークの検出を260nmでUV吸収により行った。該ピークの特性をHPLC-質量分析計により行った。

【0049】定量化を純粋標準品（ゲニステイン、ゲニステイン、ダイドジン及びダイドゼイン：購入先：Indofine Chemical Company, Sommerville, NJ）を使用して行った。応答因子（統合領域/濃度）を前記各化合物について計算し、かつ使用して未知の試料の定量を行った。純粋標準品が入手できない複合形態に関しては、応答因子を親分子のものとし、しかし分子量の相違は訂正することにより推定した。グリシチンに関する応答因子を、ゲニステインに関する応答因子とし、しかし分子量の相違を訂正して、推定した。この方法を各それぞれのイソフラボンの定量について適用した。容易に行うため、全ての複合形態をそのそれぞれの非複合形態に転換した場合、総ゲニステイン、総ダイドゼイン及び総グリシチンを計算することができ、これらの化合物の総計重量を示した。また、これらの総計を酸加水分解を使用し複合形態を転換する方法により直接測定することができる。独占的権利及び優先権を求める本発明の実施態様を特許請求の範囲に特定する。

フロントページの続き

(72)発明者 バーバラ エイ ブライアン  
アメリカ合衆国 ミズーリー州 63130  
ユニヴァーシティ シティ パーシ  
ン アベニュー 7039

(72)発明者 マリアン シー オールレッド  
アメリカ合衆国 イリノイ州 62234 コ  
リンズヴィル ボーネンスティール ロー  
ド 168

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☒ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**